

H⁺-ATP合成酵素F₁の回転触媒機構の構造的な研究

Structural Study on the Mechanism of Rotary Catalysis of H⁺-ATP Synthase

代表研究者 大阪大学 阿久津 秀 雄 Osaka University Hideo AKUTSU
協同研究者 大阪大学 藤 原 敏 道 Osaka University Toshimichi FUJIWARA
大阪大学 八 木 宏 昌 Osaka University Masahiro YAGI

F₁-ATPase is a motor protein. The TF₁β subunit, which carries the catalytic site of this enzyme, consists of 473 amino acids (52 kD). We completed more than 90% assignments of the backbone NMR signals by the segmental isotope labeling method and TROSY. A new insight into the mechanism of the F₁ rotation has been provided by the assignments of the backbone NMR signals. On adding MgADP, signals located only in the nucleotide binding domain shifted, suggesting that the β subunit's conformation changes even as a monomer on nucleotide binding. The confirmed conformational change from the open to closed forms is realized through two steps, namely, the first step induced by F420 and the second step induced by K164, T165 and D252. The flexibility in the nucleotide binding domain also plays an important role. This conformational change can be an important driving force for the F₁ rotation. The conformational analysis of β subunit-ATP complex by solid-state NMR under magic angle spinning was also carried out.

研究目的

H⁺-ATP合成酵素は生体膜の内外に形成されたプロトン濃度勾配に基づく電気化学ポテンシャルをATPの高エネルギー結合へと変換する特異な酵素である。この酵素はATP(アデノシン三リン酸)を合成するF₁部位とH⁺を通すF₀部位からなり、F₁は水相にF₀は膜中に存在している。さらに、ATP合成の逆反応を用いて、触媒反応にはF₁の回転が必要であることが吉田・木下らによって示された。H⁺-ATP合成酵素の反応機構に対する理解はWalkerらのF₁結晶構造解析、吉田・木下らのF₁の回転の証明によって大きく前進した。しかし、分子構造レベルでの本質的な理解には至っていない。結晶構造は一定の分解能の構造情報を与えるが、あくまでも静的なものであるため、機能発現機構に直接結びつかない。1分子観測は分子の全体的運動をみることはできるが、構造的分解能が十分でない。そこでわれわれは分子構造と機能発現の関

係を最も直接的に明らかにしうる核磁気共鳴法(NMR)を用いて、この酵素の回転触媒反応の構造的メカニズムを解明することを目指している。

溶液 NMR は高い分解能で構造と機能発現の関係を解析できる強力な方法である。しかし、分子量が大きくなるとスペクトルの分解能が下がるため、解析が困難になることが最大の弱点である。本研究においてはこれを3つの方法で克服することを目指した。第1に、アミノ酸置換とアミノ酸選択的安定同位体標識により、選択的構造情報を取り出す。第2に、区分安定同位体標識法を用いることにより大きな分子量の酵素の一部分を安定同位体標識する。これによりシグナルの数が減少し、見かけ上小さな分子を取り扱う場合と同じになる。さらに、TROSYというNMR測定法を用いることにより、分子量増大由来の線幅の広がりを抑えて高分解能のスペクトルを得る。これらの方法が成功すれば、F₁複合体のように30万以上の分子

量のタンパク質でも NMR による機能発現の直接的解析ができる可能性がある。今日まで積み上げられた分子生物学的データを基にしたアミノ酸置換を上記の方法と併せ用いることにより機能と構造の関係の詳細な解析が可能になる。第3には固体 NMR 法の適用である。この方法はスペクトルの質が分子量に依存しないという点で溶液 NMR よりも優れているが、分解能や構造情報がまだ十分でない。本研究ではより有効な測定法の開発を進める。このように、新しい研究法の開発を進めることにより H⁺-ATP 合成酵素のような解析不可能と考えられてきた巨大な系の解析を可能にし、回転触媒機構解明への道を切り開くことを目指す。

研究経過

1. 溶液 NMR による H⁺-ATPase β サブユニットの構造変化機構の解明

溶液 NMR において分子量の増加はスペクトル解析を困難にする主な要因の一つである。近年、緩和によるシグナルの広幅化は試料の重水素化や TROSY、CRIPT-TROSY といったパルス系列を用いることで改善されつつある。ところが、残基数の増加によるシグナルの重なりはよりシビアな問題である。インテインを用いた区分選択標識はこの問題の解決に非常に有意義な手法である。我々は 473 アミノ酸残基からなる分子量 5 万の H⁺-ATPase β サブユニットにこの手法を適用した。このタンパク質は F₁ 複合体中では基質結合によって Open form から Closed form へ構造が変化することが知られている。この構造変化のメカニズムを解明するため、単体の β サブユニットの主鎖の帰属を区分標識と重水素化、TROSY を組み合わせることによって行った。

インテインを使って ¹³C、¹⁵N の標識区分が異なる 4 種の β サブユニット (それぞれ A ; 1-124、B ; 1-270、C ; 271-473、D ; 391-473 が標識されたもの) を作製した。インテインは *Pyrococcus furiosus* 由来の PI-PfuI を用いた。インテインはペプチド鎖の自己スプライシングによって、残りのペプチド (エクステイン) から抜けだし、その際にエクステインをペプチド結合でつなぎ性質のあるタンパク質である。インテインと目的タンパク質の遺伝子をそれぞれ 1 カ所ずつ切断し、それぞれの N 末端側の遺伝子を融合させたものを融合タンパク質として発現させ、同様に発現させた C 末端側の融合タンパク質と変性させた状態で混合する。これを、

リフォールディングさせ、インテインの反応を起こさせることにより目的タンパク質をつなぐ。この時、一方のみを標識した培地で発現させれば標識した部分のみの NMR シグナルが得られる。主鎖の帰属には TROSY タイプの 3D HNCA、3D HN(CO)CA、3D HNCACB、3D HN(CO)CACB スペクトルを用いた。また標識する側のフラグメントは 80% の重水素化を行った。全ての測定は pH 8.0、40°C で Bruker DRX800 を用いて行った。

インテイン反応はそれぞれ 60% 以上の反応効率で行われた。またそれぞれのスペクトルではシグナルの減少と分解能の向上が見られた。帰属は A、D のスペクトルについては 100%、B は 88%、C は 92% で、全体としては 90% 以上完了した。B、C において帰属が完全でない理由は、観測されるべきシグナルの一部が見えていないことによる。これは交換によるシグナルの広幅化が原因であると考えられる。観測出来なかった領域を結晶構造上にマッピングすると、それらはヌクレオチド結合ドメインの Hinge 部分とその周辺に位置していることが分かった (Fig. 1)。チロシンやヒスチジンの ¹H-NMR の結果を考慮にいと、この付近ではモノマーは二つの構造をとっており、その間での交換が起きていると考えられる。従って、モノマーと複合体で構造の自由度に違いがあると推測される。基質結合による構造変化を解析するため MgADP を加えて測定を行った。その結果、スペクトル B、C において特定の領域で化学シフト値の変化が見られた。再度これらの領域を結晶構造上にマッピングすると、ADP のアデニン結合ポケット周辺と Hinge 領域周辺に位置する (Fig. 2)。この変化は複合体における Open から Closed の変化に対応するものと結論できる。 β サブユニットだけでこのような構造変化が起こるといことは、F₁ 中の β サブユニットへのヌクレオチドの結合が F₁ 回転の重要なドライビングフォースになりうることを示唆している。

また構造変化を起こす上で重要な残基と考えられるリジン残基 Lys-164 をアラニン (Ala) に置換した変異体 (K164A) についても検討を行った。即ち、Lys-164 を Ala に置換した β サブユニットを 270 と 271 残基の間で切断し、1-270 アミノ酸残基のみが ¹⁵N 標識された β サブユニットと、271-473 残基のみが ¹⁵N 標識された β サブユニットを作製し、¹⁵N-¹H HSQC 測定を行った。ヌクレオチドの入っていない状態の変異体 β サブユニット



Fig. 1 The residues, the signals of which were not observed. (Black)

(K164A)のスペクトルと野生型のスペクトルを比較した。かなりの数のアミノ酸残基の化学シフト値が変化した。変化を起こしたスペクトルを結晶構造上にマッピングし分布を見てみると、Hinge 領域内、P-loop と呼ばれるリン酸基結合部位、さらにはアデニン環結合部位にまで及んでいることがわかった。Lys-164 は P-loop 内のアミノ酸残基であるため P-loop 自身が構造変化を起こしていると考えられる。また、この変異体は野生型に比べヌクレオチドの結合アフィニティーを 10^3 程度低くすることが知られている。P-loop、アデニン環結合部位の構造を微妙に変化させることによって、このアフィニティーの低下を引き起こしているという可能性が示唆できる。また、ADP の滴定も行いヌクレオチド結合状態での野生型との構造の違いも検討した。

2. 固体NMRによる $F_1(F_0F_1)\beta$ サブユニット・ATP複合体の解析

次に、分子量の壁を持たない固体NMRを用いて好熱性細菌 PS-3 の $F_1(F_0F_1)\beta$ サブユニットと ATP の複合体における ATP の構造、『基質としての ATP』の構造を解析した。固体 NMR においてはマジック角試料回転を用いることにより高分解能のスペクトルを得ることができる。全ての NMR 測定は、CMX 500 Infinity plus 核磁気共鳴装置を使用し、試料は ZrO_2 製 4 mm ϕ or 3.2 mm ϕ ローターに詰めて行った。

ATP- $F_1(F_0F_1)\beta$ サブユニット複合体の固体 NMR 試料調製法の確立

野生型 $F_1(F_0F_1)\beta$ サブユニットの遺伝子を組み込んだプラスミドによって形質転換した大腸菌株を培養、得られた菌体を超音波破碎後、陰イオン交換カラ



Fig. 2 Chemical shift perturbed regions on ADP binding. (Black)

ム、疎水カラムクロマトグラフィーにより精製、 $TF_1\beta$ サブユニットを得た。同モルの ATP、 $MgCl_2$ と混合し、安定化剤としてトレハロースをタンパク質の 50 倍モル加え、急速凍結後、凍結乾燥を行った。その後、再水和を行い、相対湿度を 76% に調節した。再水和後の複合体の ^{31}P -CPMAS NMR 測定を行い、調製試料の評価を行った。得られたスペクトル及びトレハロースを用いないで調製された複合体のスペクトルを比較したところ、トレハロースを用いて調製した試料はリン由来のピークがはっきりと三本に分裂している。複合体がトレハロースにより保護され一義的な構造をとっていることが判る。

ATP- $F_1(F_0F_1)\beta$ サブユニット複合体の固体 NMR 測定と解析

^{13}C , ^{15}N 完全標識 ATP- $F_1(F_0F_1)\beta$ サブユニット複合体の ^{13}C -CPMAS NMR 測定を行い、複合体中の ATP に由来するシグナルの確認を行った。

複合体における ATP の自己完結的な帰属を行うため、まず ^{13}C , ^{15}N 完全標識 ATP- $F_1(F_0F_1)\beta$ サブユニット複合体に対して 2D ^{13}C RFDR-1 の測定を行い、共有結合で直接結ばれた ^{13}C 同種核双極子相関の観測を試みた。

RFDR-1 では共有結合で直接結ばれた ^{13}C 間の双極子相関を観測したが、その強い双極子結合により双極子結合の弱い遠距離の磁化移動が観測されず、構造情報を得ることができない。そこで RFDR-1 を改良し、試料回転に対してのパルス数を減らすことで磁化移動を化学シフト差に選択的なものとし、C5'-C8の距離情報の観測、リボース(5')とアデニン(C8)が *anti* と *syn* のどちらの構造にあるかの決定を試みた。

^{13}C -CPMAS NMR 測定では複合体中の ATP に

由来するシグナルを ~ 1 ppm 程度の線幅ではっきりと分離確認できた。強度も強く、分解能も良かったため二次元NMRを用いて解析を試みた。2次元 ^{13}C RFDR-1の測定では複合体中のATPのリボース内及びアデニン内の ^{13}C 双極子相関を観測することができた。アデノシンの帰属結果を参考にクロスピークを順にたどり、リボース及びアデニンの ^{13}C シグナルの帰属を行うことができた。帰属結果をアデノシン、 Na_2ATP のケミカルシフト値と比較すると、いくつかのシグナルがシフトしていた。C3'の高磁場シフトは β サブユニットのPhe-420のベンゼン環の環電流効果によるもの、C2の高磁場シフトは β サブユニットのTyr-341のベンゼン環の環電流効果によるものと思われる。2次元 ^{13}C RFDR-8スペクトルを測定することによりアデニン(C8)とリボース(5')間の相関を観測することができた。C5'の対角ピークとクロスピークの強度比は0.053であった。RFDR-8によるC5'からC8への磁化移動の核間距離依存性シミュレーションの結果からC5'-C8間の距離は $3.7 \pm 0.1 \text{ \AA}$ であった。アデノシンのX線結晶構造解析によると、*anti*で 3.99 \AA 、*syn*で 5.65 \AA であることから、複合体中のATPも*anti*の構造をとっているものと考えられる。

考察

本研究によって区分標識とTROSYの組み合わせは、分子量が大きなタンパク質を溶液NMRで解析するのに有効な手段であることが示された。 $F_1\beta$ サブユニットの基質結合による構造変化を解析した結果、ADPのアデニン結合ポケット周辺とHinge領域周辺に構造が変わっていることが明らかになった。 F_1 の結晶構造では基質の結合状態により、 β サブユニットの構造が変わっている。基質が結合していないときにはN末端ドメインとC末端ドメインの間が開いたOpen formをとっており、基質が結合しているときには両ドメインが近づいたClosed formをとっている。この両者の構造の違いはまさに、基質結合部位とHinge領域に限られている。したがって、NMRの化学シフトの変化は複合体におけるOpenからClosedの変化が β サブユニットモノマーでも起こっていることを示している。 F_1 の回転は β サブユニットと回転軸となっている γ サブユニットの相互作用が β の構造変化により次々と変化するためであると考えられている。したがって、基質結合による β

サブユニットに固有な構造変化は F_1 回転の重要なドライビングフォースであると結論できる。

それでは β サブユニットの構造変化を引き起こすメカニズムは何か。Lys-164をAlaに置換すると F_1 の活性がほとんど阻害されることが知られている。この変異体(K164A)2次元NMRスペクトルを解析した結果、Open型でも野生型と比べるとHinge領域、アデニン結合ポケット、さらには比較的遠く離れた領域までシグナルが変化していた。つまりLysをAlaに置換することによってOpen型の構造が保てなくなり基質結合能力の低下を引き起こし、さらには基質が結合したとしても構造変化が起きなくなったと考えられる。今までのアミノ酸置換の実験を考慮に入れると基質結合がこのリジンの構造変化を引き起こし、それがこれの関係する水素結合ネットワークを変化させることにより、 β サブユニットの構造変化を引き起こしていると考えられる。

区分標識とTROSYの組み合わせた溶液NMRとともに、マジック角試料回転下での固体が大きな分子量の生体高分子複合体の解析に有用であることが本研究で示された。

研究発表

口頭発表

1. H. Akutsu, High-resolution Multidimensional Solid-State NMR Analysis of Biomolecules, Symposium on Biomedical Magnetic Resonance, Lucknow, India, January, 2002
2. H. Akutsu, Structural change of the β subunit and the rotation of F_1 ATPase, The 6th membrane Research and The 13th ATI International Forum, Nagoya, Japan, November 4-7, 2002.
3. 八木宏昌、山崎俊夫、吉田賢右、阿久津秀雄：区分安定同位体標識を利用した H^+ -ATPase β サブユニットの主鎖の帰属、第40回NMR討論会、京都、2001年11月
4. 松木陽、藤原敏道、阿久津秀雄：MAS条件下で同種核二量子双極子相互作用をリカップリングできるオフセット帯域の、RFパルス列による制御、第40回NMR討論会、京都、2001年11月
5. 阿久津秀雄： F_1 -ATPaseの回転を制御する β サブユニットの構造変化、第24回日本分子生物学会年会、横浜、2001年12月

6. 泉顕也、八木宏昌、岩淵友幸、山崎俊夫、吉田賢右、阿久津秀雄：ATPase β サブユニットの構造変化における Lys-164 の役割、第 2 回日本蛋白質科学会年会、名古屋、2002 年 6 月
7. 阿久津秀雄：固体高分解能 NMR によるタンパク質の構造機能解析、日本化学会第 82 秋季年会、豊中、2002 年 9 月
8. 八木宏昌、山崎俊夫、吉田賢右、阿久津秀雄：区分標識と TROSY を用いた ^1H -ATPase β サブユニットの構造解析、第 41 回 NMR 討論会、東京、2002 年 11 月
9. 松木陽、藤原敏道、阿久津秀雄： ^1H 間距離測定のための ^1H - ^1H 二量子双極子結合固体 MAS 2 次元 $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ 化学シフト相関法、第 41 回 NMR 討論会、東京、2002 年 11 月

誌上発表

1. K. Tozawa, H. Yagi, K. Hisamatsu, K. Ozawa, M. Yoshida, and H. Akutsu, Functions and ATP-binding responses of the twelve histidine residues in the TF_1 -ATPase β subunit. *J. Biochem.*, 130, 527 - 533 (2001).
2. T. Sato, T. Kawakami, K. Akaji, H. Konishi, K. Mochizuki, T. Fujiwara, H. Akutsu and S. Aimoto, Synthesis of a membrane protein with two transmembrane regions. *J. Peptide Sci.* 8, 172-180 (2002).
3. Y. Matsuki, H. Akutsu and T. Fujiwara, Band-Selective Recoupling of Homonuclear Double-Quantum Dipolar Interaction with a Generalized Composite 0degrees Pulse: Application to ^{13}C Aliphatic Region-Selective Magnetization Transfer in Solids. *J. Magn. Reson.*, in press